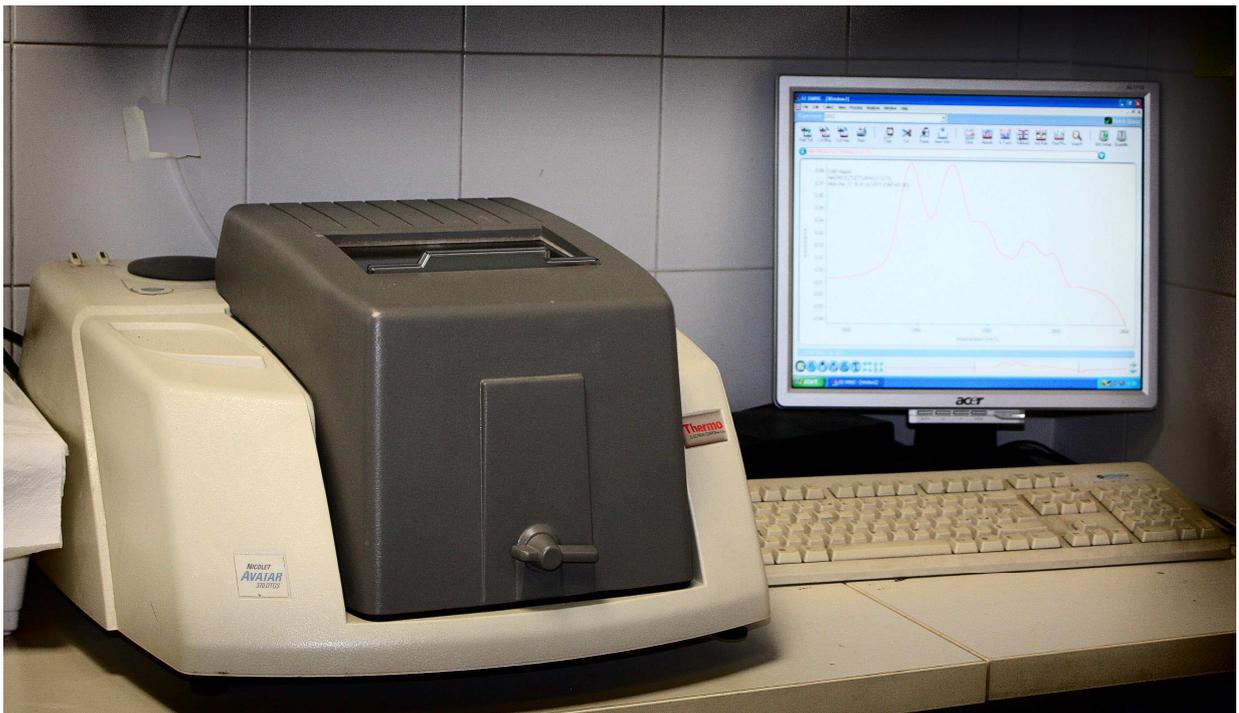


**Determinazione di idrocarburi pesanti in sedimenti e  
suoli mediante spettrofotometria infrarossa con  
trasformata di Fourier**

di

*Serena Gherardi, Marianna Del Core, Michele Iavarone, Lidia  
Prevedello, Paola Rumolo, Daniela Salvagio Manta, Stella  
Tamburrino, Mattia Vallefucio e Mario Sprovieri*



Gennaio 2012

## **INDICE**

1) Introduzione	pag. 3
2) Spettrofotometria IR a Trasformata di Fourier	pag. 5
3) Scelta del solvente	pag. 8
4) Sedimenti marini	pag. 9
4-1) campionamento e stoccaggio campioni	pag. 9
4-2) reattivi e soluzioni occorrenti	pag. 9
4-3) attrezzatura occorrente	pag.10
4-4) preparazione	pag. 11
4-5) estrazione e purificazione del campione	pag. 12
4-6) analisi	pag. 13
4-6-1) lo strumento FT-IR Nicolet Avatar 370 DTGS	pag. 13
4-6-2) manutenzione ordinaria dello strumento	pag. 17
4-6-3) parametri e retta di calibrazione	pag. 21
4-7) calcoli	pag. 25
5) Validazione del metodo	pag. 26
5-1) detection limit	pag. 28
5-2) limite di determinazione	pag. 29
5-3) precisione	pag. 29
5-4) accuratezza	pag. 30
5-5) sensibilità	pag. 31
5-6) campo di misura	pag. 32
5-7) incertezza di misura	pag. 32
6) Conclusioni	pag. 33
7) Bibliografia	pag. 35

## 1. INTRODUZIONE

La necessità di quantificare in modo veloce, ripetibile e a costi relativamente bassi la concentrazione di idrocarburi non volatili, ci ha indotto a mettere a punto una procedura analitica adeguata.

Il metodo si basa sulla determinazione degli idrocarburi pesanti mediante spettrofotometria all'infrarosso (*FT-IR*); in sintesi, il procedimento consiste nell'estrarre il campione con tetracloroetene, nell'effettuare un clean-up su gel di silice finalizzato all'eliminazione delle sostanze polari e nella lettura in *FT-IR*.

La concentrazione degli idrocarburi è confrontata con una curva di calibrazione ottenuta con soluzioni di riferimento a concentrazioni note.

Nel mettere a punto il protocollo d'analisi ci si è trovati ad affrontare una serie di problemi legati in primo luogo alla definizione dei composti organici identificati come "idrocarburi pesanti" e in secondo luogo, alla realizzazione in laboratorio di un'adeguata procedura di estrazione ed analisi.

Con il termine "idrocarburi" si fa riferimento alle indicazioni della normativa vigente in Italia e in particolare al Decreto Ministeriale 471/99 (Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22) (1) e alle sue successive modificazioni e integrazioni: d.lgs. 152/06 (Norme in materia ambientale) (2), Decreto Ministeriale 7 novembre 2008 (allegato A) (3), D.M. Ambiente del 4 agosto 2010 (4).

Secondo tali riferimenti, gli idrocarburi totali (TPH) sono da considerarsi come la sommatoria degli idrocarburi leggeri ( $C \leq 12$ ) e idrocarburi pesanti ( $C > 12$ ) (4).

La loro analisi deve essere effettuata separatamente viste le loro caratteristiche chimico-fisiche differenti.

In attesa di specifiche metodiche di riferimento, l'Istituto Superiore di Sanità osserva che la determinazione della frazione idrocarbureica più pesante può essere determinata con tecniche IR.

La tecnica analitica in spettrofotometria infrarossa (IR) (metodo EPA 8440) infatti non permette di determinare le frazioni idrocarburiche più volatili che evaporano durante l'estrazione dei campioni. (5)

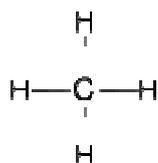
Tale normativa inoltre mette in evidenza le concentrazioni soglia di contaminazione in relazione alla specifica destinazione d'uso della matrice investigata, differenziando la matrice suolo, sottosuolo e acque; in particolare nel suolo il valore limite di concentrazione di C>12 è di 50 mg/kg (per i siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale) e di 750 mg/kg (per i siti ad uso commerciale e industriale). (2)

A questo punto è bene dare una definizione di idrocarburi.

Gli idrocarburi sono composti organici che contengono soltanto atomi di idrogeno e carbonio, privi cioè di gruppi funzionali. Gli atomi di carbonio (C) sono legati tra loro a formare lo scheletro della molecola, mentre gli atomi di idrogeno (H) sono legati direttamente a questo scheletro.

In base al tipo di legame che il carbonio può avere con un altro atomo di carbonio, gli idrocarburi si distinguono in:

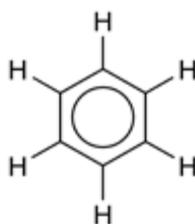
1. saturi (alcani), cioè composti che contengono il massimo numero di atomi di idrogeno compatibili con la tetravalenza del carbonio e con la monovalenza dell'idrogeno. Il più semplice idrocarburo saturo è il metano



**Figura 1:** molecola del metano

2. insaturi (alcheni e alchini), cioè idrocarburi che contengono un numero inferiore di atomi di idrogeno rispetto al massimo possibile, poiché almeno due atomi di carbonio sono legati tra loro da un doppio o triplo legame.

3. aromatici, cioè idrocarburi le cui molecole, a struttura ciclica, presentano una particolare distribuzione della nuvola elettronica, che conferisce loro alcune tipiche proprietà. Il più semplice idrocarburo aromatico è il benzene.



**Figura 2:** molecola del benzene

A seconda del loro stato fisico in condizioni di pressione e di temperatura ambientali, gli idrocarburi possono essere anche suddivisi in:

idrocarburi solidi o semisolidi (asfalto, bitume ecc.)

idrocarburi liquidi (petrolio)

idrocarburi gassosi (metano, etano, propano, butano). (6)

È bene ricordare che gli idrocarburi possono essere lineari, ramificati o ciclici e per questo motivo, in questo lavoro, verranno presi in considerazione tutti i tipi di legame del carbonio con l'idrogeno (cioè  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}$ )

Gli idrocarburi pesanti sono molecole inerti e con alto peso molecolare, sono poco tossiche e poco volatili; la loro pericolosità per l'ecosistema è causata dal loro abbandono nell'ambiente (e soprattutto in mare). È noto infatti che per la loro degradazione viene consumato ossigeno, sottratto alle forme di vita marina. Inoltre gli idrocarburi essendo molecole immiscibili in acqua, tendono a separarsi da essa e, poiché hanno una densità minore, galleggiano sull'acqua stessa, impedendo ai raggi solari di attivare i processi di fotosintesi necessari al fitoplancton.

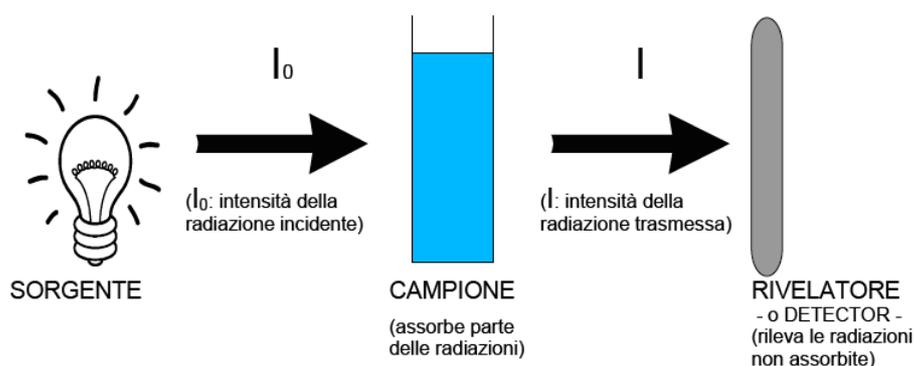
Per questo motivo l'ISS considera pericolosi per la salute umana e per l'ambiente acquatico, gli idrocarburi solo se la concentrazione degli stessi è maggiore di 1000 mg/kg o se contiene almeno uno degli idrocarburi policiclici aromatici classificato come pericoloso o prioritario. (3)

## **2. SPETTROFOTOMETRO IR A TRASFORMATA DI FOURIER**

Per poter ottenere i migliori risultati con costi contenuti e nel rispetto dell'ambiente si è scelto, per l'analisi degli idrocarburi  $\text{C}>12$ , di mettere a punto

una metodologia di indagine analitica in spettrofotometria *IR* a Trasformata di Fourier (FT-*IR*).

Un'analisi spettrofotometrica consiste nella misura delle radiazioni elettromagnetiche e nell'analisi dello spettro generato; ogni sostanza assorbe o emette radiazioni di lunghezza d'onda ben determinata: l'analisi dello spettro permette di individuare la natura delle sostanze in esame; la misura dell'intensità delle radiazioni emesse o assorbite permette di risalire alla quantità di sostanza analizzata. Uno spettro può essere ottenuto facilmente e in poco tempo, ponendo una piccola quantità della sostanza in esame in uno spettrofotometro. Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione, in altre parole l'assorbimento risulta direttamente proporzionale alla concentrazione (legge di Lambert-Beer). Poiché uno spettrofotometro è in grado di misurare l'assorbimento, esso è in grado di determinare facilmente anche la concentrazione di una soluzione.



**Figura 3** Interazione tra radiazione e campione.(7)

La scelta del tipo di spettrofotometro da adoperare viene effettuata in base ai tipi di analisi da svolgere. Per avere informazioni sui gruppi funzionali presenti nei composti organici e quindi, indirettamente, sulle molecole stesse, viene impiegata la *spettrofotometria infrarossa* (IR). Si tratta di una tecnica basata sulla capacità delle radiazioni *IR* (di lunghezza d'onda compresa tra 0,78 e 100 micron) di provocare variazioni nelle vibrazioni dei legami; in particolare ciò si verifica quando la radiazione possiede una frequenza uguale o multipla di quella naturale del legame. Gli elementi caratteristici di uno spettrofotometro sono così definiti:

- *sorgente*, la parte dell'apparecchio che emette la radiazione policromatica contenente cioè tutte le lunghezze d'onda del campo richiesto;
- *fenditura di ingresso*, posta dopo la sorgente, per rendere paralleli i raggi ed evitare così luce diffusa nello strumento;
- *monocromatore*, elemento in grado di selezionare uno stretto intervallo di lunghezze d'onda a partire da un raggio policromatico;
- *cella*, la componente destinata a contenere il campione da esaminare; essa deve essere trasparente alla radiazione impiegata e deve avere un ben preciso "cammino ottico" (spessore del campione, corrisponde alla lunghezza percorsa dalla radiazione nel campione) che dovrà essere sufficiente ad avere assorbimenti rilevabili dallo strumento;
- *rivelatore* o *detector*, dispositivo che produce un segnale elettrico proporzionale all'energia della radiazione che lo investe;
- *schema di elaborazione e presentazione dei dati*.

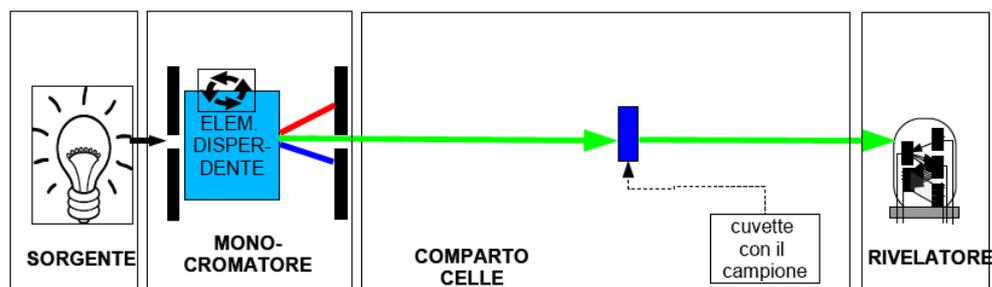


Figura 4 Schema generale di uno spettrofotometro.(7)

Nel campo dell'infrarosso è stato utilizzato lo spettrofotometro a *Trasformata di Fourier* che presenta notevoli variazioni rispetto alla struttura generale dello strumento.

Nello spettrofotometro FT-IR non è presente un monocromatore ma l'informazione sulle diverse frequenze è ottenuta attraverso l'uso di un *interferometro di Michelson*, che modula la radiazione nel tempo, e una successiva operazione matematica sui dati (trasformata di Fourier). (7)

I vantaggi che si ottengono utilizzando la tecnica FT-IR sono:

- rapidità di esecuzione;
- accuratezza e precisione;

- sensibilità discrete;
- costi relativamente bassi;

Gli svantaggi che presenta il metodo FT-IR sono:

- molti solventi di preparazione sono tossici;
- non esistono solventi completamente trasparenti;

### 3. SCELTA DEL SOLVENTE

La scelta del solvente idoneo è limitata da un certo numero di fattori.

In primo luogo, il solvente non deve reagire con il composto in esame e in secondo luogo deve assorbire poco nella regione spettrale *IR* interessata.

Infine, deve essere compatibile con il materiale con il quale sono fatte le celle che conterranno il campione.

I solventi organici più utilizzati, per analisi *IR*, sono il tetracloruro di carbonio e il solfuro di carbonio, i cui atomi di carbonio non contengono legami con gli atomi di idrogeno.

Il più utilizzato per questa analisi, grazie alle sue caratteristiche apolari, è il tetracloruro di carbonio (nome IUPAC tetraclorometano), detto anche freon 10.

I problemi legati all'uso di questo solvente sono la sua dimostrata tossicità e cancerogenicità: nel presente lavoro si è scelto di non utilizzare il tetracloruro di carbonio bensì il tetracloroetene, molto meno tossico e cancerogeno. (8)

La sostituzione è stata possibile dopo aver confrontato gli spettri di soluzioni standard, bianchi e matrici certificate preparati con i due solventi.

Legata alla scelta del solvente, è anche la scelta della cuvetta che conterrà il campione per l'analisi spettrofotometrica. In questo caso si è scelto di utilizzare cuvette in quarzo con cammino ottico da 10 mm. Questo perché il quarzo non viene degradato dai solventi utilizzati o dal campione stesso ed è trasparente alle radiazioni *IR*.



**Figura 5:** cuvetta

#### **4. SEDIMENTI MARINI**

##### **4-1. CAMPIONAMENTO E STOCCAGGIO**

Il campione di sedimento prelevato per l'analisi di idrocarburi deve essere omogeneizzato *in situ* prima del prelievo, per evitare che la disomogeneità del campione possa dare dei risultati non attendibili.

Il campione è raccolto con una spatola di acciaio decontaminata e posto in un contenitore sterile in polietilene precedentemente etichettato con i dati inerenti il campione: nome, coordinate della stazione di prelievo, profondità e data del prelievo; infine viene conservato a -20°C fino al momento della lavorazione per evitare che i processi metabolici dei batteri normalmente presenti nei sedimenti possano alterarne il contenuto idrocarburico. (9)

##### **4-2. REATTIVI E SOLUZIONI OCCORRENTI**

1. tetracloroetene per analisi in tracce;
2. sodio solfato anidro per analisi, trattato a 400° C per almeno 4 ore e conservato in essiccatore;

3. gel di silice 70-230 mesh per cromatografia su colonna;
4. azoto anidro;
5. soluzioni standard di n-esadecano –  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ ;
6. soluzioni standard di isooctano –  $(\text{CH}_3)_3\text{CCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$ ;
7. soluzioni standard di clorobenzene –  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$ ;

#### **4-3. ATTREZZATURA OCCORRENTE**

1. matracci in vetro con tappo in vetro smerigliato da 50 ml;
2. provetta SVL30 d=40X100 mm, con fondo tondo, completa di tappo a vite SVL30 in SMOV-1 SS ON-OFF VALVE;
3. pipette Pasteur in vetro da 1 ml;
4. spettrofotometro FT-IR Nicolet Avatar 370 DTGS;
5. cuvette in quarzo suprasil®300 con cammino ottico da 1 cm;
6. bilancia analitica
7. colonnine cromatografiche in vetro con rubinetto in teflon o in polipropilene con filtri in polietilene o cotone idrofilo;
8. bagno ad ultrasuoni con una potenza di 40 KHz;
9. centrifuga per provettoni di cui al punto 2;
10. cappa per manipolazioni di sostanze organiche con filtro a carboni attivi;

Tutta la vetreria utilizzata è in vetro pyrex per evitare le contaminazioni, ma soprattutto per evitare che il tetracloroetene possa degradare le parti di natura organica, inoltre il vetro pyrex è molto resistente agli shock termici.

La vetreria è stata accuratamente lavata per 12 ore in soluzione acquosa al 5% di detergente RBS, sciacquata con acqua corrente prima e con acqua distillata poi e infine asciugata in stufa a 70° C e trattata con tetracloroetene prima dell'utilizzo (il tetracloroetene di scarto viene analizzato all'FT-IR per accertarsi dell'assenza di spettri interferenti).



**Figura 6:** attrezzatura occorrente (in senso orario: FT-ir, bagno ad ultrasuoni, colonna cromatografica montata su beuta codata, bilancia analitica, provetta per estrazione e centrifuga,. Al centro: cappa per manipolazione di sostanze organiche).

#### **4-4. PREPARAZIONE:**

Il campione di sedimento, una volta scongelato, viene posto in stufa a 35°C fino a completa asciugatura.

In seguito il campione viene pestato e omogeneizzato tal quale (3), in un mortaio di agata con l'ausilio di un mulino planetario (Retsch PM100).

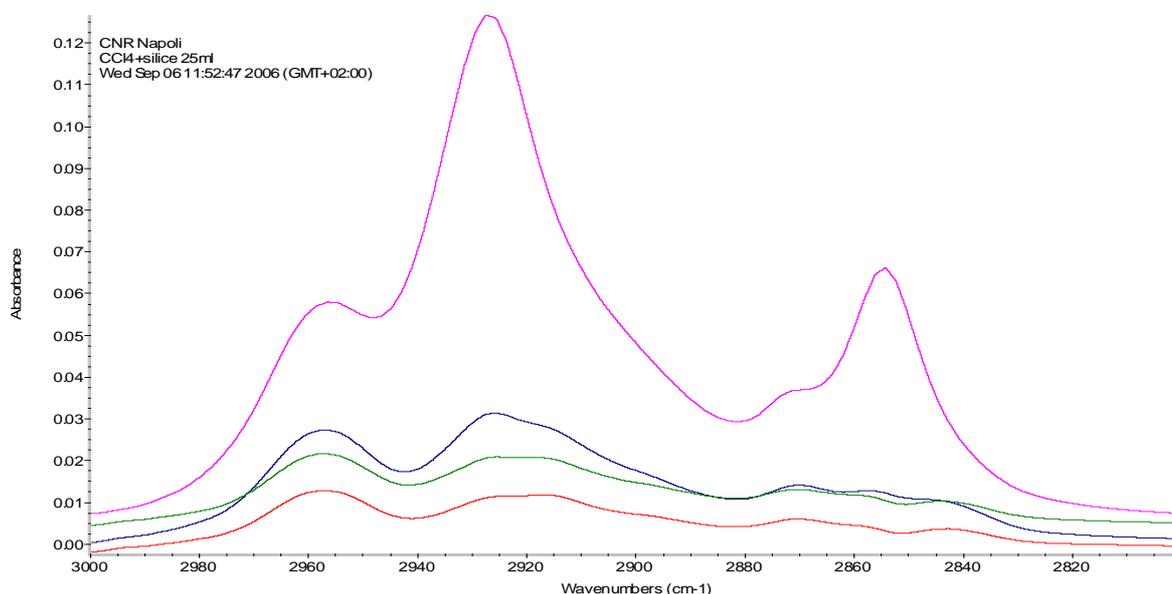
#### 4-5. ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DEL CAMPIONE

Vengono pesati 2 grammi di campione in una provetta da centrifuga (punto 2 par. "attrezzatura occorrente"), si aggiungono 25 ml di tetracloroetene e si estrae in bagno ad ultrasuoni (FALC instrument serie LBS2) per 30 minuti a temperatura ambiente ad una frequenza di 40 HKz, come descritto nel Metodo EPA 3550B. (10)

Si centrifuga il campione a 2000 r.p.m. per 15 minuti in modo da separare nettamente il sedimento dall'estratto.

L'estratto viene recuperato e fatto percolare in una colonna cromatografica, composta da 0.5 gr. di gel di silice e 0.5 gr. di sodio solfato anidro, (quest'ultimo preventivamente posto a 400°C per 4 ore e conservato in un essiccatore). (11)

La colonna cromatografica è preventivamente attivata con 25 ml di tetracloroetene che viene poi analizzato per controllare l'assenza di bande che possano alterare il buon esito della lettura all'infrarosso (ad esempio la presenza di acqua viene rilevata proprio nell'intervallo di assorbimento preso in considerazione), quindi scartato.



**Figura 7:** In rosa è rappresentato lo spettro di vibrazione delle molecole dopo lavaggio della silice con 10 ml di tetracloruro di carbonio; in blu dopo lavaggio con 15 ml, in verde dopo 20 ml e in rosso dopo lavaggio con 25 ml di solvente. L'analisi quantitativa dello spettro in rosso ha dato risultato 2,5 mg/kg.

L'estratto viene fatto percolare attraverso la colonna cromatografica e quindi raccolto in un matraccio da 50 ml.

Al campione vengono aggiunti altri 25 ml di tetracloroetene; la procedura viene quindi ripetuta integralmente.

Il secondo estratto viene fatto percolare in una seconda colonna cromatografica preparata ed attivata allo stesso modo della prima.

L'estratto viene raccolto nello stesso matraccio e portato a volume di 50 ml con tetracloroetene.

L'analisi degli estratti ottenuti dalla lavorazione di un campione di matrice certificata (di cui si allega il certificato d'analisi a pagina 23) ha messo in risalto (come espresso in tabella 1) che, dopo la prima estrazione, il recupero di idrocarburi è dell'87% mentre effettuando una doppia estrazione si può raggiungere il 93,6% di recupero.

In accordo con l'obiettivo proposto di mettere a punto una metodica che abbia costi relativamente bassi e che sia di basso impatto ambientale, si è opportunamente deciso di effettuare un'unica estrazione.

	1ª estrazione (mg/kg)	2ª estrazione (mg/kg)	Valore di riferimento matrice certificata
Matrice certificata	575,4*	619,2*	661
% recupero	87%	93,6%	

**Tabella 1** percentuale di recupero del metodo di estrazione  
\*: media aritmetica ottenuta analizzando 10 volte la matrice certificata

## **4-6. ANALISI**

### **4-6-1. LO STRUMENTO FT-IR Nicolet Avatar 370 DTGS**

Lo strumento in dotazione al laboratorio di geochimica organica dell' I.A.M.C.-C.N.R di Napoli, dove sono state condotte le prove relative a questo lavoro, è l'FT-IR della ditta THERMO, modello Nicolet Avatar 370 DTGS.



**Figura 8:** FT-IR

Tale spettrofotometro è corredato di due software che permettono un'agevole gestione dei processi di calibrazione ed analisi.

Il software TQ analyst EZ viene utilizzato per la creazione di curve di calibrazione per l'analisi quantitativa dello spettro, mentre il software EZ OMNIC viene utilizzato per la lettura dello spettro e la determinazione del contenuto di idrocarburi.

Le caratteristiche del software TQ analyst EZ includono:

- *processing* e selezione degli spettri,
- gestione del cammino ottico,
- diagnostica,
- elaborazione dati per un'analisi quali-quantitativa,
- correzione algoritmica del metodo.

Il software è facilmente utilizzabile a tutti i livelli di esperienza dell'operatore.

Un "software wizards" suggerisce risposte alle domande di base e guida allo sviluppo dei metodi.

Le funzioni principali di questo software includono inoltre:

- ricerca dei campioni
- distanza dalla sorgente
- confronto con la sorgente
- utilizzo della Legge di Lambert Beer

- regressione lineare multipla (SMLR)

Questo programma è complementare al software EZ-OMNIC.

Ez –Omnice è un'interfaccia semplificata con le funzioni dell'FT-IR;

Le caratteristiche di questo software includono:

- raccolta, analisi e controllo dei dati
- controllo di qualità
- archiviazione e stampa degli spettri
- permette il funzionamento dei metodi quantitativi
- effettua sottrazione spettrale
- corregge la linea di base
- seleziona i picchi di interesse

Grazie al "customizable toolbar" è in grado di ottimizzare lo spettrofotometro in base all'ambiente di lavoro.

Infine, questo software è in grado di effettuare un controllo sulla condizione dello strumento in modo da rilevare eventuali guasti e segnalare l'accessorio da controllare.

Per quanto riguarda l'analisi da noi effettuata, sono stati dettati allo strumento specifici parametri:

- formato dello spettro: assorbanza,
- tipo di sorgente utilizzata: IR,
- range di assorbanza: 3015-2800, (10)
- numero di scansioni da effettuare:32,

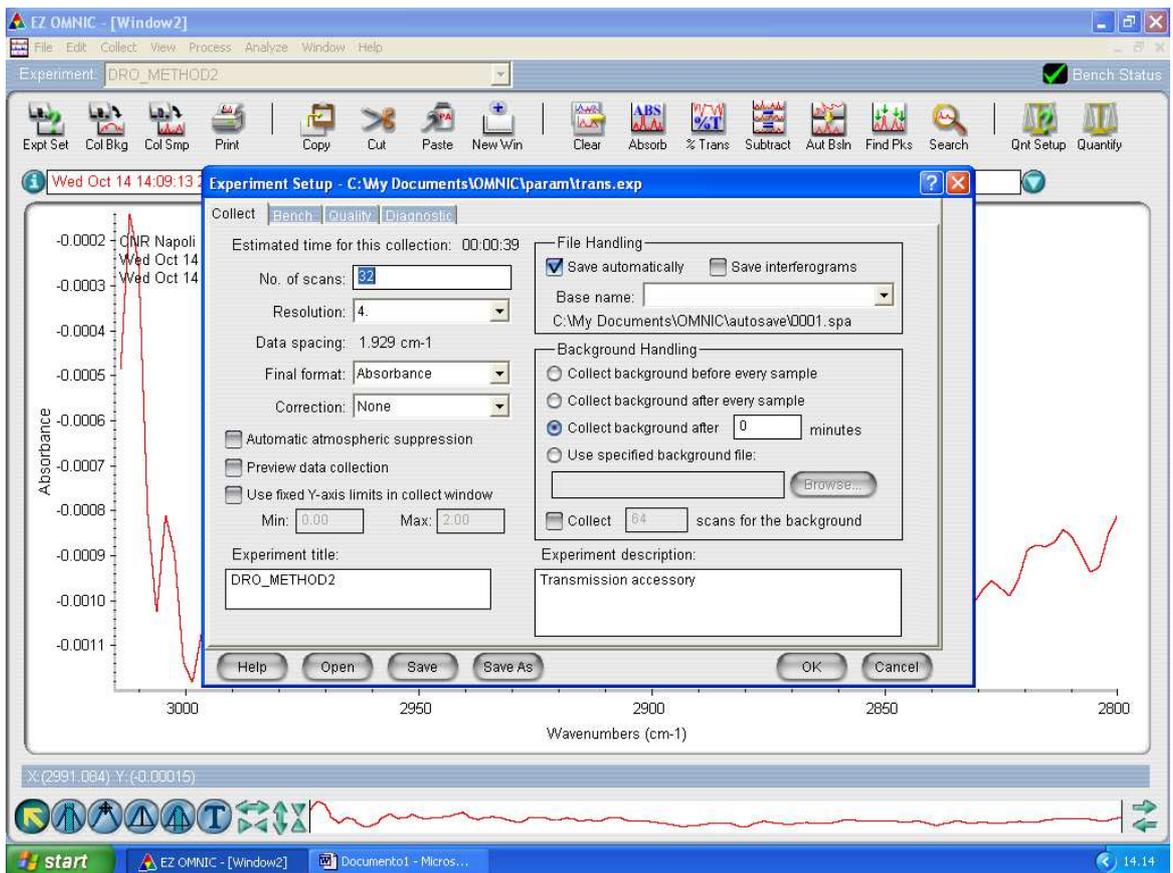


Figura 9: parametri per la scansione

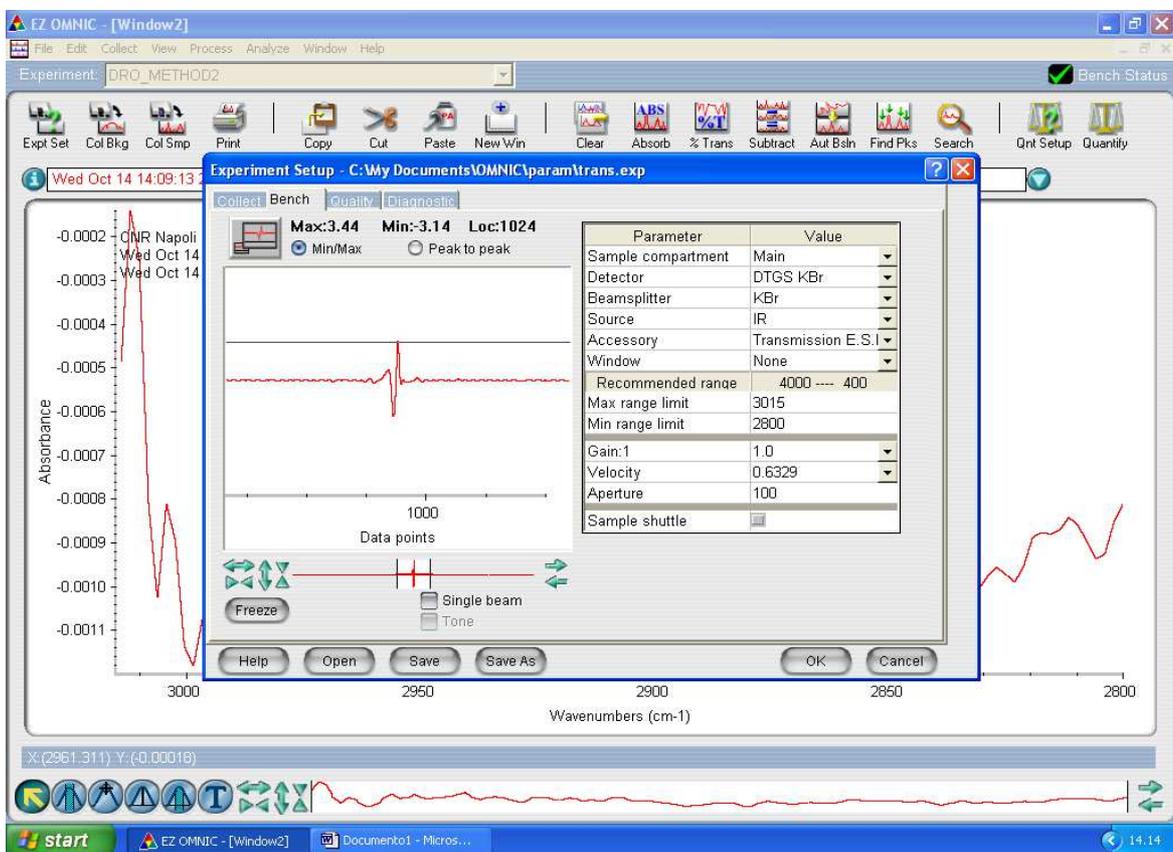


Figura 10: parametri per l'acquisizione degli spettri

## 4-6-2. MANUTENZIONE ORDINARIA DELLO STRUMENTO:

Lo strumento non ha bisogno di una particolare manutenzione, è bene però operare un allineamento delle lenti almeno una volta alla settimana.

L'allineamento delle lenti interne è utilizzato per l'adattamento dei parametri rispetto all'ambiente circostante; va effettuato anche quando lo strumento subisce spostamenti.

In questa fase, è bene che il piano d'appoggio dove è posizionato lo strumento non subisca vibrazioni o movimenti di alcun genere.

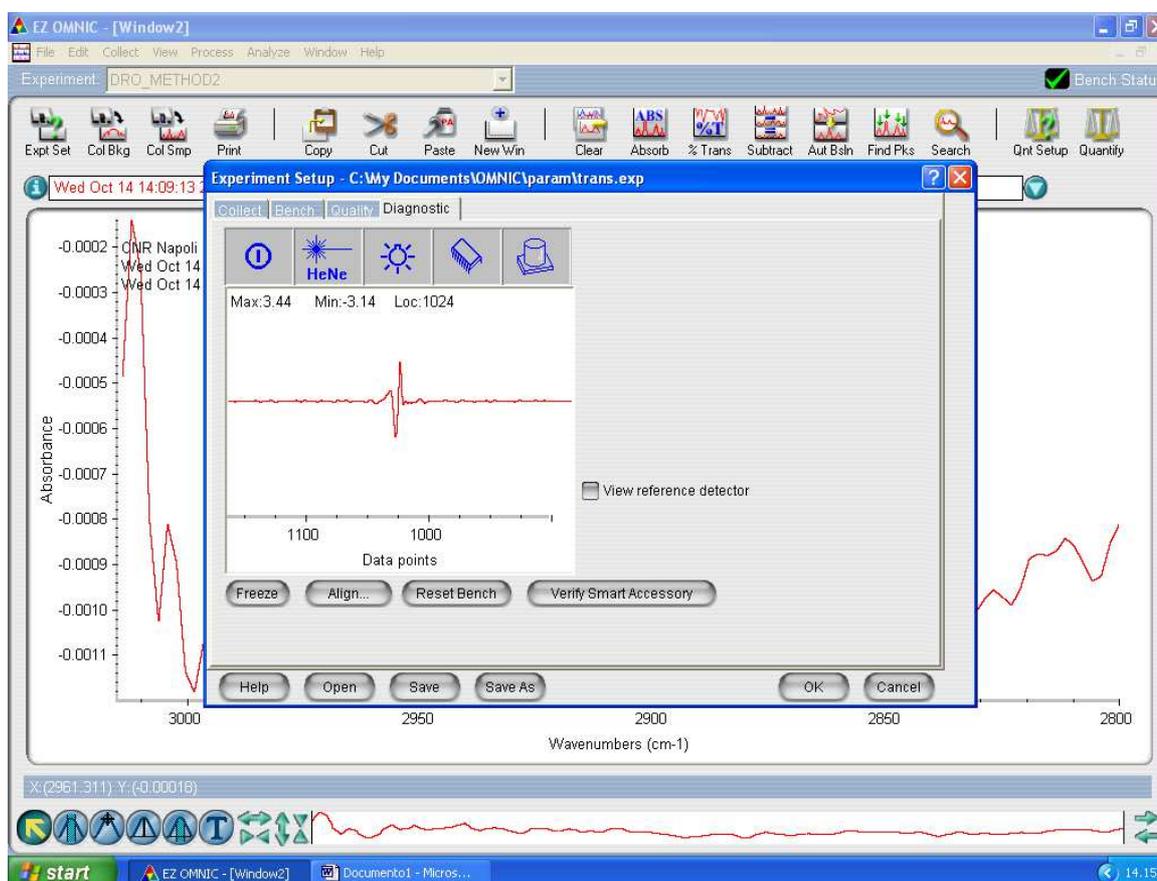
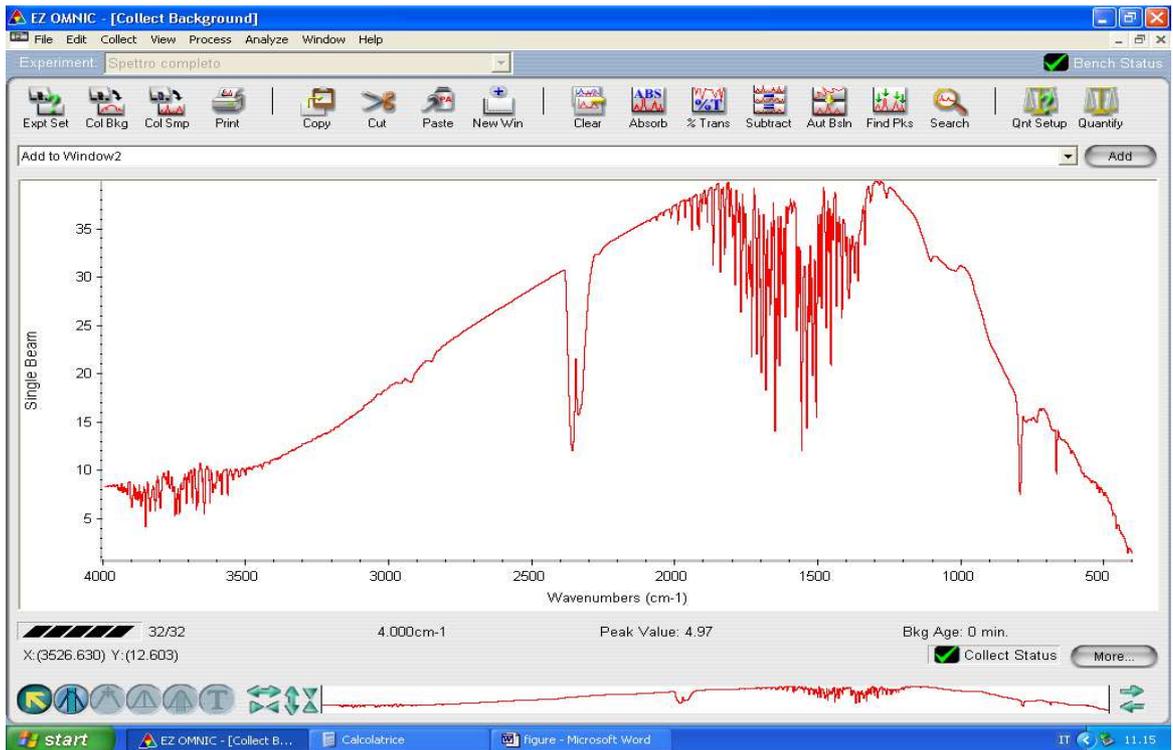


Figura 11: diagnostica per l'allineamento delle lenti

Prima di iniziare qualunque operazione, va controllato l'essiccatore che si trova sulla parte superiore dello strumento e sostituito ogni qualvolta il dischetto di carta azzurra diventa rosa.

Tutte le mattine lo strumento va testato effettuando un background (o rumore di fondo).



**Figura 12** Background dello spettro completo: esso comprende l'intero spettro da 400 a 4000 nm. (il software permette di selezionare solo la porzione di spettro che interessa).

Dopo essersi accertati dell'assenza di interferenze, è prassi effettuare un bianco utilizzando una cuvetta porta-campione con tetracloroetene puro.

Si è notato che l'utilizzo del tetracloroetene provoca un picco negativo tra 2910 e 2885  $\text{cm}^{-1}$ .(8)

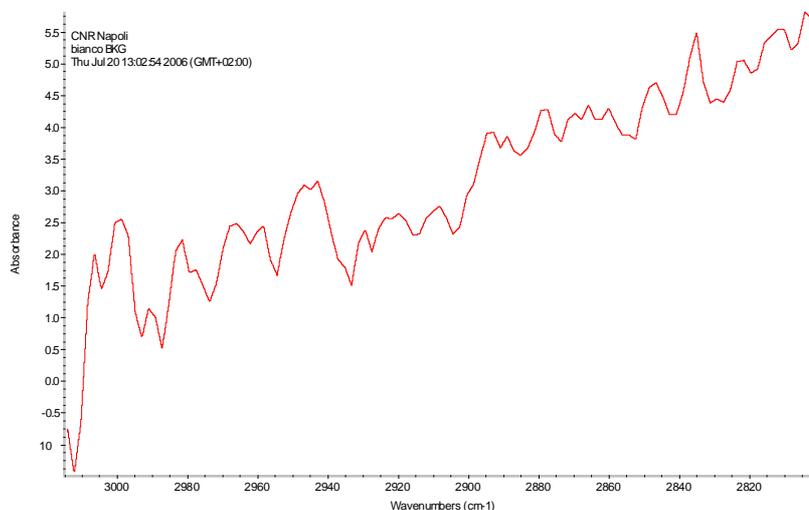
Per eliminare queste interferenze, si effettua un background introducendo la cuvetta utilizzata in precedenza per il bianco, nel vano porta-campioni dello strumento: in questo modo si avrà la reale situazione dello "spazio" in cui verrà effettuata l'analisi.



**Figura 13:** vano porta-campioni



**Figura 14** Bianco.



**Figura 15** Bianco azzerato con il background.

È importante notare che in questa metodica sono molti gli effetti esterni che possono comportare un'alterazione del risultato finale dell'analisi.

Per questo motivo si consiglia di effettuare un bianco e uno standard all'inizio e alla fine di ogni utilizzo o comunque ogni 10 campioni circa.

Per ridurre al minimo gli errori dovuti alla lavorazione del campione e ai recuperi dell'estrazione, si consiglia di effettuare un bianco di preparazione e un campione a titolo noto per ogni step di estrazione.

Durante l'utilizzo dell'FT-IR, è necessario evitare la formazione dei cosiddetti "buchi spettrali".

All'interno della regione spettrale presa in considerazione per questa analisi, la radiazione nel suo cammino dalla sorgente al detector, viaggia in aria; eventuali presenze di vapore acqueo potrebbero comportare assorbimento indesiderato della radiazione IR e la creazione di "buchi spettrali".

Al fine di ridurre questo effetto, durante il funzionamento dello strumento viene erogato azoto anidro in modo che esso possa sostituirsi all'aria e all'umidità all'interno del vano dove avviene il cammino delle radiazioni.

È stato scelto l'azoto perché esso è un gas inerte che non ha quindi nessuna interazione con il campione, non è tossico per l'operatore ed è trasparente alle radiazioni IR.

#### **4-6-3. PARAMETRI E RETTA DI CALIBRAZIONE**

Dopo aver ottimizzato i parametri dello strumento, viene costruita una retta di calibrazione poiché l'analisi quantitativa degli idrocarburi viene effettuata comparando lo spettro del campione da analizzare con lo spettro di uno standard a titolo noto.

La soluzione di riferimento secondo il metodo EPA 8440, viene preparato con:

- 0.05 gr. di n-esadecano, (idrocarburo lineare)
- 0.05 gr. di isottano (idrocarburo ramificato)
- 0.05 gr. di clorobenzene (idrocarburo aromatico)

Si porta a volume fino a 100 ml con tetracloroetene (soluzione madre da 1500 mg/kg).

Si effettuano delle diluizioni della soluzione madre in modo da ottenere standard da 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 e 8 mg/kg. (12)

I vari standard vengono quindi misurati in FT-IR.

Un'analisi qualitativa dei tre standard utilizzati separatamente, ha evidenziato che il benzene influisce ben poco sull'analisi poiché assorbe ad una frequenza al di fuori del range di assorbanza utilizzato.

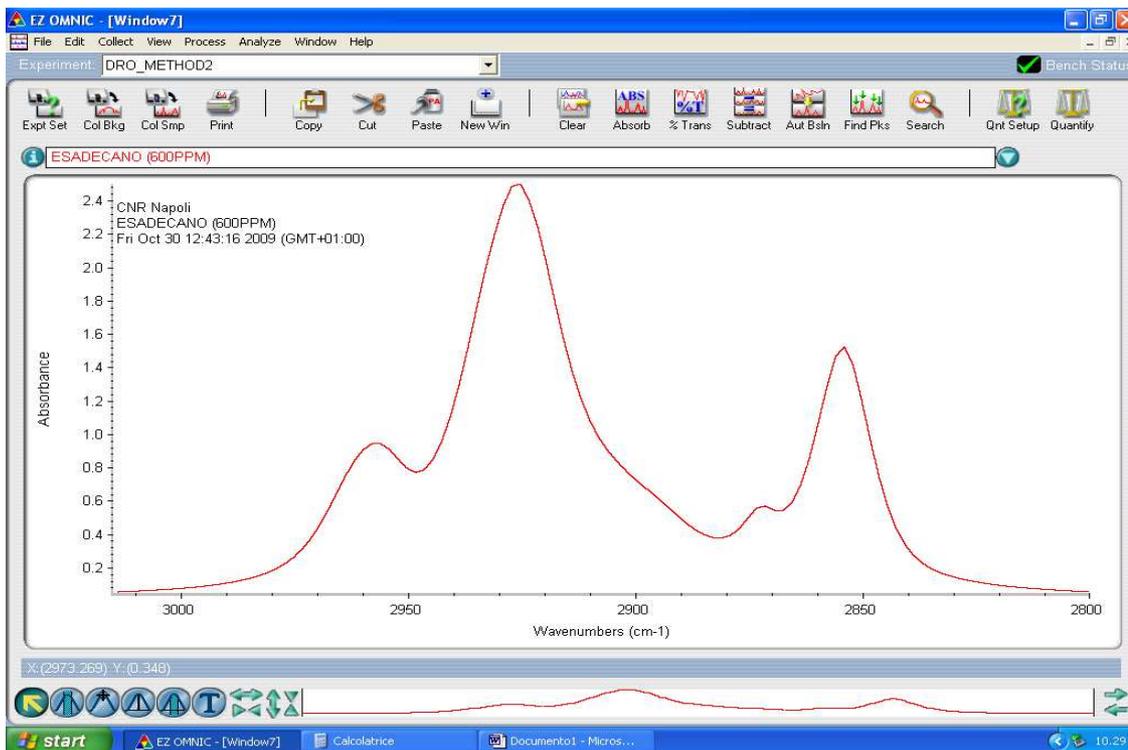


Figura 16: spettro dell'esadecano (caratterizzato dai legami CH2)

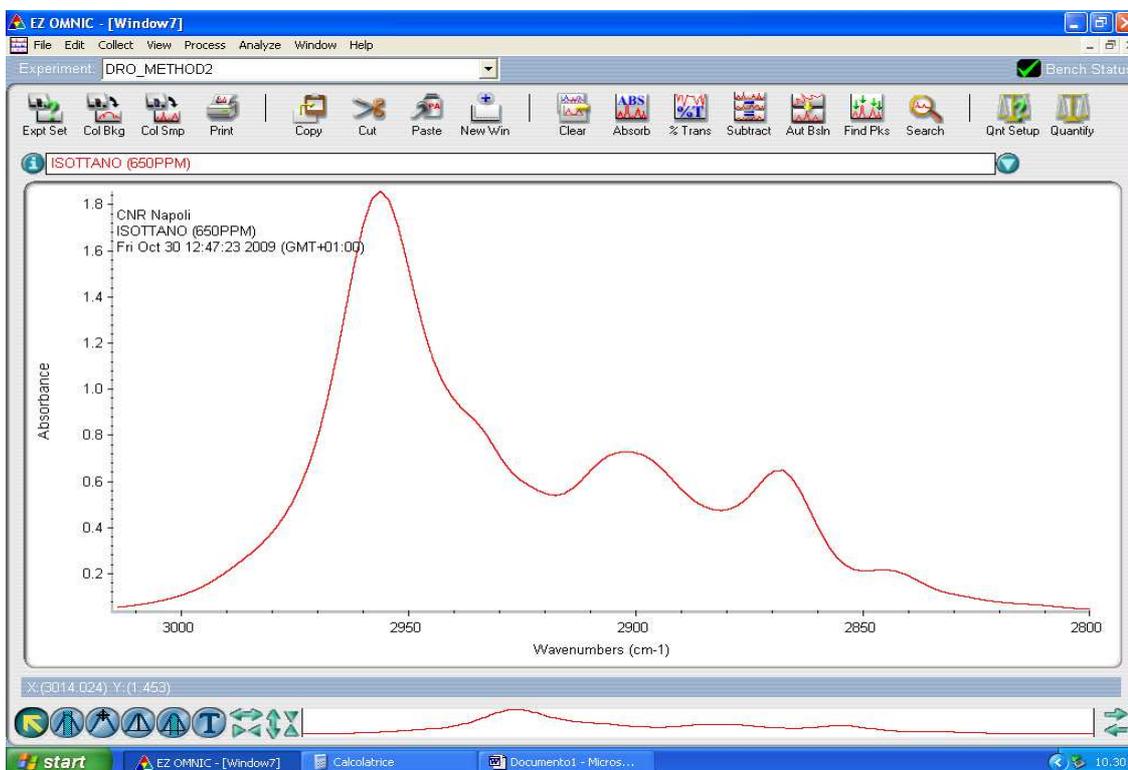


Figura 17: spettro dell'isottano (caratterizzato dai legami CH3)

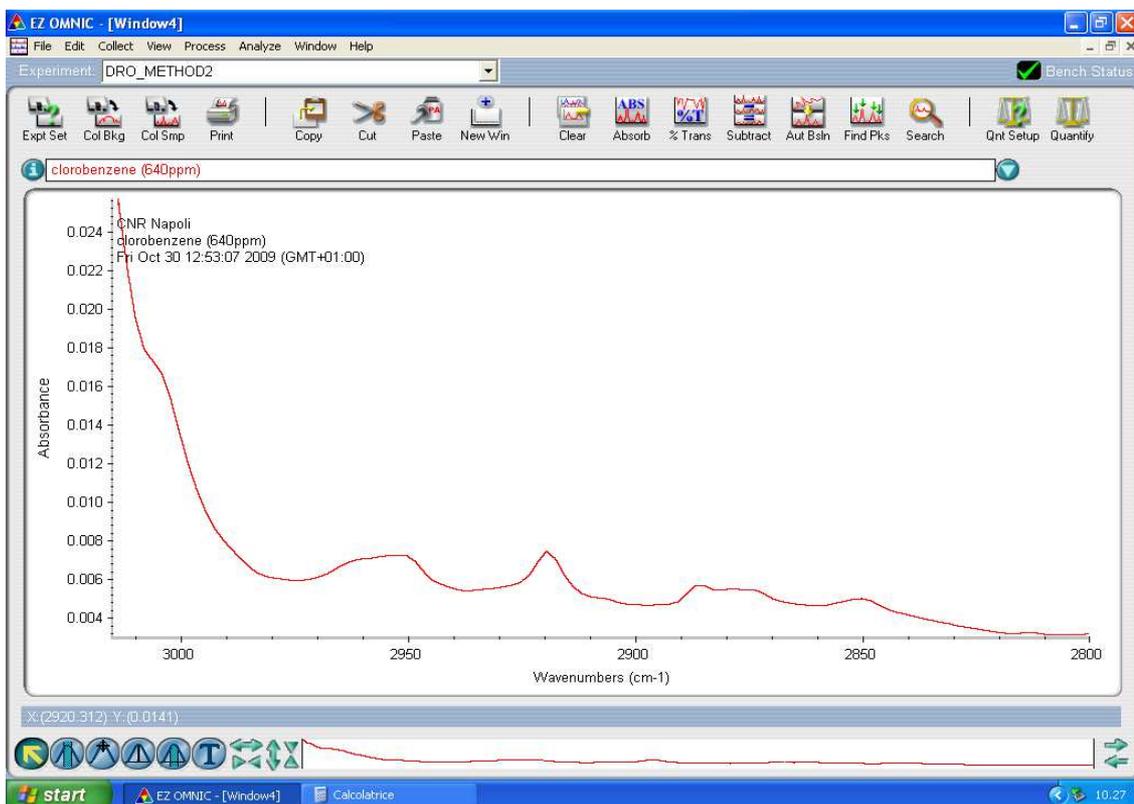


Figura 18: spettro del clorobenze all'interno del range di assorbanza preso in considerazione per l'analisi (2800-3010  $\text{cm}^{-1}$ )

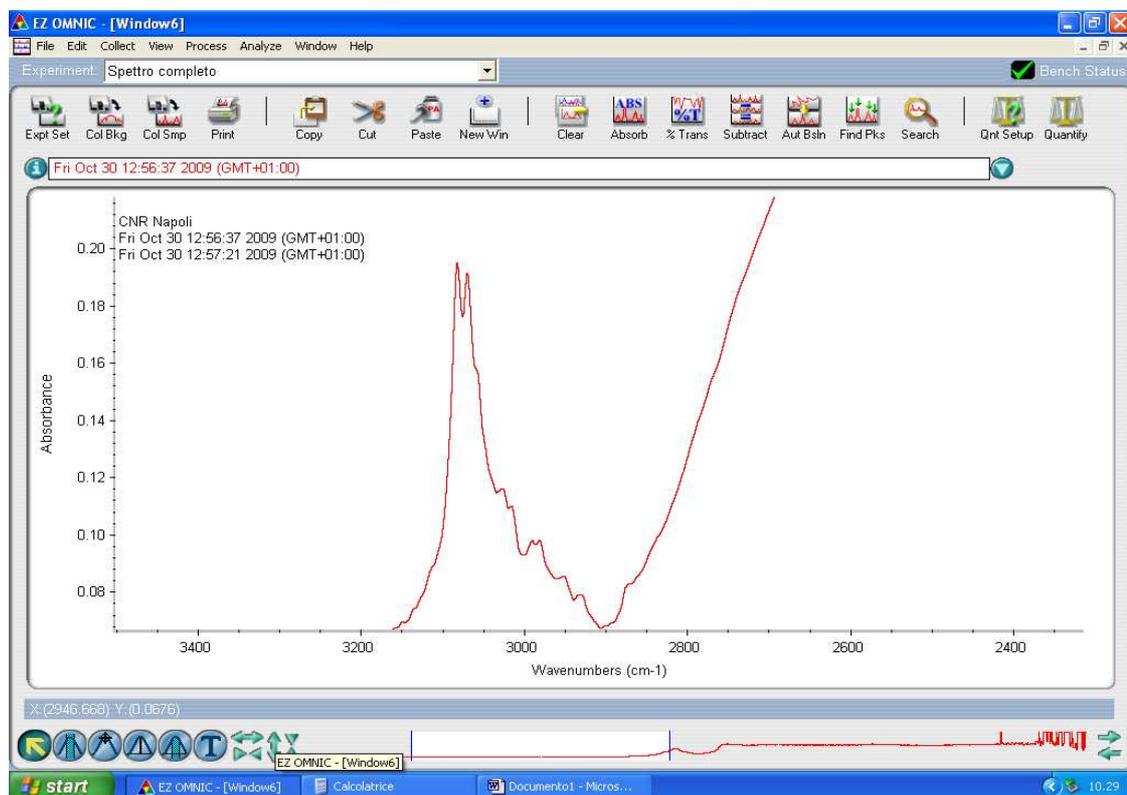


Figura 19: spettro del clorobenze. Esso viene assorbito ad una frequenza  $3100 \text{ cm}^{-1}$

Data la sua dimostrata tossicità, e in accordo con quanto previsto dall'ASTM (American Society for Testing and Materials), si è deciso che il benzene non risulta necessario all'interno delle soluzioni standard.

Viene quindi generata una retta di calibrazione.

La retta viene costruita definendo le seguenti impostazioni:

- non deve passare per l'origine.
- l'unità di misura impostata è mg/kg
- lo spettro di assorbanza è relativo all'intervallo 3000 a 2800  $\text{cm}^{-1}$ . (12)

La retta viene costruita ponendo sull'asse delle Y le concentrazioni in mg/kg degli standard, e sull'asse delle X le aree corrispondenti ricavate dallo strumento.

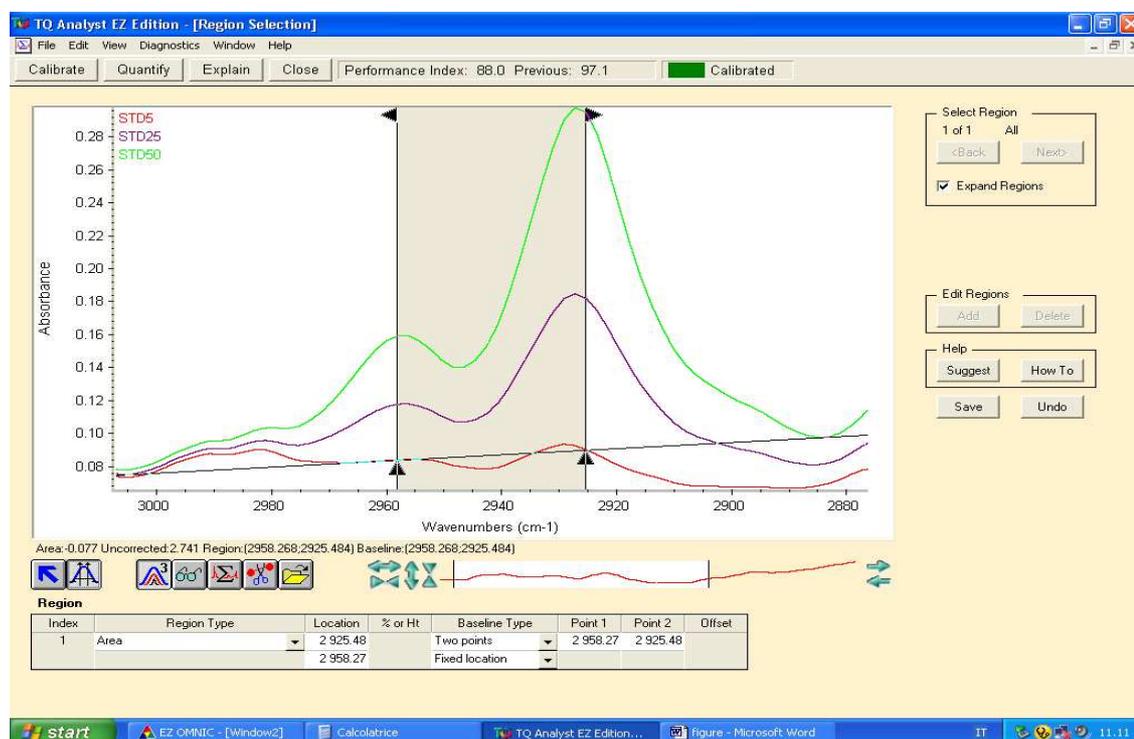


Figura 20: Parametri per la retta di calibrazione.

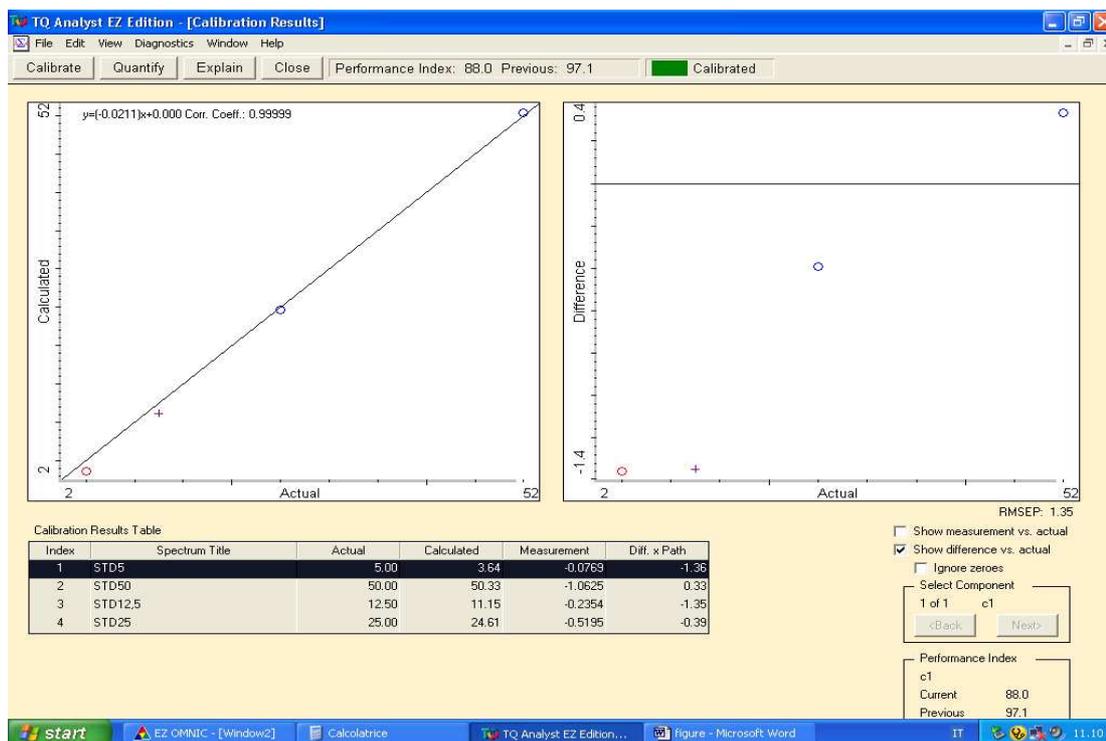


Figura 21: Retta di calibrazione

#### 4.7- CALCOLI

La concentrazione di idrocarburi pesanti viene calcolata secondo la formula:

$$\underline{C > 12 = (A \cdot V) / P}$$

dove :

A = quantità degli idrocarburi pesanti espressi in mg/kg, data dall'area dei picchi compresi nella regione dello spettro presa in considerazione

V = volume finale del campione estratto espresso in millilitri

P = peso secco iniziale del campione espresso in grammi.

## 5. VALIDAZIONE DEL METODO

Il fine di questo lavoro è stato anche quello di verificare l'affidabilità del procedimento analitico proposto.

Al fine di validare questo metodo sono state effettuate prove sia sullo strumento, mediante soluzioni standard e sia sulla preparazione del campione grazie ad una matrice certificata della ditta RTC (codice CRM560-100) di cui si allega certificato di analisi (Fig.21).

I test effettuati sia sugli standard che sulla matrice certificata hanno permesso di calcolare il detection limit, il limite di determinazione, la precisione, l'accuratezza, la sensibilità, il campo di misura e l'incertezza dello strumento e del metodo d'analisi.

## NATURAL MATRIX CERTIFIED REFERENCE MATERIAL

Catalog No: CRM560-100  
Lot No: 002533

### DIESEL IN SOIL

#### ANALYTE CONCENTRATIONS

<u>Compound</u>	<u>Reference Value</u>	<u>S.D.</u>	<u>Confidence Interval</u>	<u>Prediction Interval</u>
Diesel Range Organics (DRO)	661	202	551 - 694	215 - 1030

All values are expressed in mg/kg (parts per million) on a wet weight (as received) basis. The Reference Value was determined by USEPA SW846 (3rd edition) Method 8015B.

The Confidence Interval (C.I.) range is the 95% C.I. for the Reference Value. The Prediction Interval (P.I.) is the 95% P.I. around the Reference Value. Measurements should fall within the P.I. 19 of 20 times.

The Certified Reference Values were established through extensive interlaboratory testing. All values were calculated using the USEPA BIWEIGHT Method.

**“THIS PRODUCT WAS DESIGNED, PRODUCED AND VERIFIED FOR ACCURACY AND STABILITY IN ACCORDANCE WITH USEPA/AALA RM-03, AND ISO GUIDES 34 AND 35.”**



\_\_\_\_\_  
Certifying Officer

Store at +4°C

MSDS available upon request

**Figura 22:** Certificato di analisi della matrice certificata

## 5-1. DETECTION LIMIT

Il detection limit (o limite di rilevabilità o ldr) è definito come la concentrazione o massa minima di analita, che è rilevabile con ragionevole affidabilità da una certa procedura analitica. (13)

Da ciò si può dedurre che uno strumento o un metodo analitico non possono dimostrare che una determinata sostanza chimica sia assente ma solamente che essa non possa essere opportunamente rilevata.

Per calcolare il detection limit dello strumento è stato misurato un bianco (composto da 3 ml di tetracloroetene puro) letto per sette volte per tre giorni non consecutivi (tabella 2).

La media dei valori ottenuti è stata aggiunta a 3 volte la deviazione standard delle misure effettuate. (14)

Campioni	1°giorno	2°giorno	3°giorno
<b>B1</b>	0.6 mg/kg	0.0 mg/kg	0.5 mg/kg
<b>B2</b>	0.6 mg/kg	0.1 mg/kg	0.4 mg/kg
<b>B3</b>	0.7 mg/kg	0.0 mg/kg	0.5 mg/kg
<b>B4</b>	0.6 mg/kg	-0.6 mg/kg	0.5 mg/kg
<b>B5</b>	0.4 mg/kg	0.0 mg/kg	0.5 mg/kg
<b>B6</b>	0.5 mg/kg	-0.1 mg/kg	0.4 mg/kg
<b>B7</b>	0.5 mg/kg	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg
<b>D.L.</b>		<b>1.3 mg/kg</b>	

**Tabella 2:** Detection limit dello strumento

Per calcolare il detection limit del metodo analitico è stato allestito un campione bianco e preparato secondo la procedura descritta nel paragrafo 4-2.

È stato analizzato sette volte e ripetuto per tre giorni non consecutivi (tabella 3).

La media dei valori ottenuti è stata aggiunta a tre volte la deviazione standard delle misure effettuate.

Campioni	1° giorno	2° giorno	3° giorno
<b>Bprep1</b>	1.6 mg/kg	1.2 mg/kg	-0.6 mg/kg
<b>Bprep2</b>	1.6 mg/kg	1.4 mg/kg	-0.3 mg/kg
<b>Bprep3</b>	1.6 mg/kg	1.4 mg/kg	-0.6 mg/kg
<b>Bprep4</b>	1.6 mg/kg	1.2 mg/kg	-0.6 mg/kg
<b>Bprep5</b>	1.5 mg/kg	1.4 mg/kg	-0.6 mg/kg
<b>Bprep6</b>	1.5 mg/kg	1.1 mg/kg	-0.3 mg/kg
<b>Bprep7</b>	1.5 mg/kg	1.5 mg/kg	-0.3 mg/kg
<b>D.L.</b>		<b>3.6 mg/kg</b>	

**Tabella 3:** Detection limit del metodo analitico

## 5-2. LIMITE DI DETERMINAZIONE:

È il più basso tenore di analita misurabile con ragionevole certezza statistica.

Il limite di quantificazione sarà numericamente uguale alla media dei bianchi di preparazione più 10 volte la deviazione standard dei bianchi di preparazione diviso il coefficiente angolare della retta di calibrazione usata per l'analisi.

Prendendo in considerazione i risultati ottenuti per il detection limit del metodo, e considerando che il coefficiente angolare ( $r$ ) della nostra retta di calibrazione è di 0.999, si può ragionevolmente affermare che il limite di determinazione di questo metodo è di 10.1 mg/kg

## 5-3. PRECISIONE:

È il grado di convergenza di dati individualmente rilevati su un valore medio della serie cui appartengono. In statistica la precisione è esprimibile in termini di deviazione standard.

La precisione è anche definita come:

- ripetibilità: la dispersione di valori ottenuta usando gli stessi operatori, nelle stesse condizioni ed in un tempo ragionevolmente breve
- riproducibilità: la dispersione ottenuta compiendo le stesse misurazioni con strumenti ed operatori differenti e/o su un tempo relativamente lungo.

Minore è l'intervallo di incertezza del dato, maggiore sarà la precisione.

Per calcolare la precisione dello strumento usato è stato preparato uno standard da 100 mg/kg (è una concentrazione che fa parte della retta di calibrazione usata, ma non è un valore usato per costruirla).

Lo standard è stato letto dieci volte, e il calcolo della percentuale della deviazione standard delle misure effettuate ha dato la precisione dello strumento (tabella 4).(15)

Concentrazioni ottenute in mg/kg										
<b>STD-100</b>	103.9	102.7	103.7	103.6	104.0	100.8	101.0	100.7	104.0	100.0
<b>Precisione</b>	<b>1.6%</b>									

**Tabella 4:** Precisione dello strumento

Per calcolare, invece, la precisione del metodo utilizzato è stata estratta e lavorata per 10 volte nella stessa giornata 2 grammi di matrice certificata e la percentuale della deviazione standard delle misure effettuate ha dato la precisione del metodo (tabella 5).(15)

Concentrazioni ottenute in mg/kg										
<b>M.C.</b>	546	415	486	455	685	781	810	588	445	558
<b>Precisione</b>	<b>21%</b>									

**Tabella 5:** Precisione del metodo analitico

#### 5-4. **ACCURATEZZA:**

L'accuratezza è il grado di corrispondenza del dato teorico, desumibile da una serie di valori misurati, con il dato reale o di riferimento. (15)

Uno standard da 100 mg/kg è stato letto 10 volte in FT-IR; la percentuale della differenza tra la media dei valori ottenuti e il valore reale dello standard ha dato l'accuratezza dello strumento. Minore è tale percentuale, più accurato sarà il dato. Se si fa riferimento alla tabella 4 risulta evidente che l'accuratezza del nostro spettrofotometro è di 2.4%.

Per quanto riguarda, invece, l'accuratezza del metodo analitico, sono stati preparati e analizzati per 5 volte, 2 grammi di matrice certificata.

La percentuale della differenza tra la media dei valori ottenuti e il valore di riferimento citato nel certificato di qualità allegato in figura 21, ha dato l'accuratezza del metodo.

Facendo riferimento alla tabella 5, si può calcolare l'accuratezza in 12.7%.

#### 5-5. SENSIBILITA':

La sensibilità di uno strumento di misura è il rapporto tra la variazione del valore ottenuto dalla lettura strumentale e la variazione del valore reale atteso.

Più il rapporto è vicino all'unità, più lo strumento è sensibile.

In questo caso si è provveduto a preparare una serie di standard che sono stati letti più volte in FT-IR e la loro media (R) è stata divisa per il valore che ci si aspettava (E) (tabella 6)

	<b>E (mg/kg)</b>	<b>R (mg/kg)</b>	<b>SENSIBILITA'</b>
<b>STD-1</b>	1500,0	1421,67	0,9
<b>STD-2</b>	1000,0	915,6	0,9
<b>STD-3</b>	500,0	498,5	1,0
<b>STD-4</b>	250,0	254,9	1,0
<b>STD-5</b>	125,0	120,5	1,0
<b>STD-6</b>	100,0	91,2	0,9
<b>STD-7</b>	62,5	63,7	1,0
<b>STD-8</b>	50,0	50,1	1,0
<b>STD-9</b>	31,2	29,6	0,9
<b>STD-10</b>	25,0	26,2	1,0
<b>STD-11</b>	15,6	16,0	1,0
<b>STD-12</b>	7,8	9,3	1,2
<b>STD-13</b>	3,9	6,3	1,6
<b>STD-14</b>	2,0	5,0	2,6

**Tabella 6:** Sensibilità dello strumento

Dalla tabella 6 si può evincere che lo strumento perde di sensibilità al di sotto di 7.8 mg/kg.

In egual maniera potrà essere calcolata la sensibilità del metodo.

Utilizzando la media dei valori calcolati per la matrice certificata (tab.5) e dividendoli per il valore espresso nel certificato d'analisi (figura 21) si può stimare la sensibilità del metodo in 0,9 mg/kg

#### 5-6. CAMPO DI MISURA:

Grazie al calcolo della sensibilità si è in grado di determinare anche il campo di misura del nostro strumento.

Un campo di misura è l'intervallo tra il più alto e il più basso livello di analita determinabile con precisione ed accuratezza applicando il metodo stesso.

Utilizzando i valori della tabella 6 è stato costruito un grafico che mette in evidenza che il range di misura a cui applicare il metodo con precisione e accuratezza è tra 8 e 1000 mg/kg.

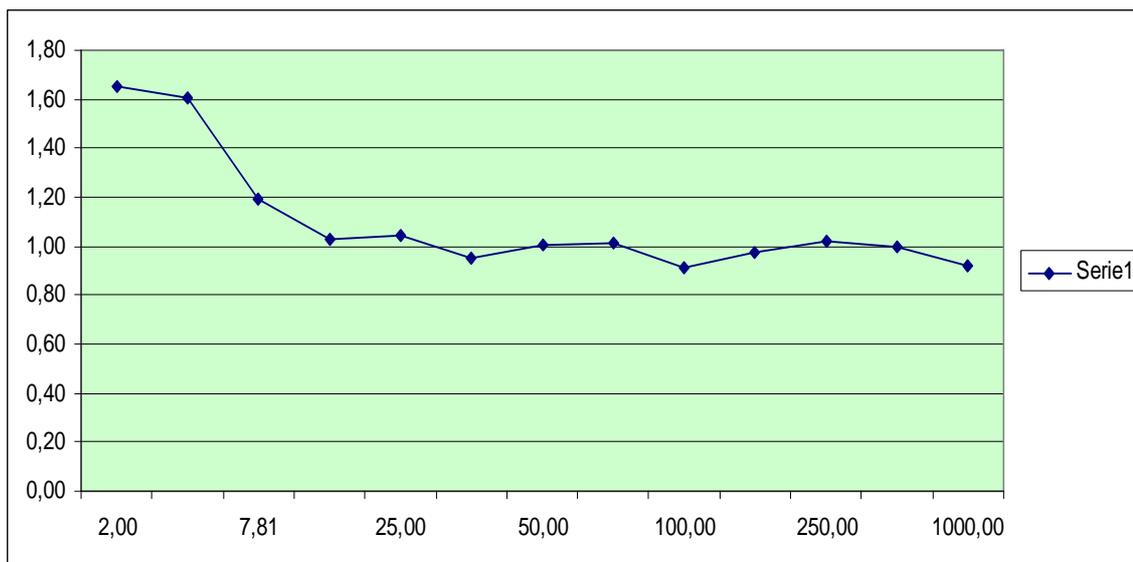


Figura 23: campo di applicazione del metodo

#### 5-7. INCERTEZZA DI MISURA:

È una stima legata ad un risultato di prova che caratterizza l'escursione dei valori entro cui si suppone che cada il valore vero del misurando.

Ha le dimensioni di uno scarto tipo e si indica con U: (16)

$$U = \sqrt{\text{varianza}} * K = \sqrt{\text{deviazione standard}^2 * K}$$

Dove per K si intende il fattore di copertura pari a 2.

In questo caso si prende in considerazione la deviazione standard dei bianchi di preparazione espressi in tabella 2.

Quindi l'incertezza di misura del metodo è di  $\pm 1.9$  mg/kg.

## 6- CONCLUSIONI:

In sintesi, gli aspetti fondamentali di questo lavoro sugli idrocarburi, sono essenzialmente due: la velocità di esecuzione (tenendo sempre presente i criteri fondamentali di qualità) e il rispetto per l'ambiente.

Le analisi effettuate in FT-IR su sedimenti marini permette di verificare la presenza di idrocarburi pesanti con una buona riproducibilità e accuratezza, e soprattutto in linea con la vigente normativa italiana che prevede la sola distinzione degli idrocarburi in leggeri e pesanti (1-2-3-4).

Dai test effettuati sullo strumento, è risultato che l'FT-IR Nicolet Avatar 370 DTGS della ditta Thermo, ha un limite di rilevabilità (detection limit) accettabile visto che il limite di quantificazione richiesto dal decreto legislativo 7 novembre 2008 (allegato A) è di 1.5 mg/kg.

Il suo campo di applicazione è di 8-1000 mg/kg con un'incertezza di misura pari a  $\pm 1.9$  mg/kg.

Per concentrazioni maggiori si consiglia di effettuare diluizioni crescenti fino al rientro nel range del campo di applicazione; per concentrazioni minori si consiglia un'ulteriore analisi in gascromatografia.

Per quanto riguarda i test effettuati sul metodo da noi messo a punto, esso è utile per un'analisi su sedimenti marini con un intervallo di concentrazione compreso tra 100 e 12500 mg/kg  $\pm 1.9$  mg/kg.

È utile, inoltre tenere presente che per la norma ISO/IEC 17025, sono considerati accettabili recuperi compresi tra 70-110% e con una precisione  $\leq 45\%$  (15) (con questo metodo abbiamo ottenuto recuperi medi dell'83% con una precisione pari al 21%)

In secondo luogo, vale la pena sottolineare l'eliminazione dell'uso del benzene per la costruzione della retta di calibrazione e la sostituzione del tetracloruro di carbonio a favore dell'utilizzo del tetracloroetene, per un maggior rispetto dell'ambiente.

La loro eliminazione era inevitabile a causa dell'effetto tossico e cancerogeno che tali sostanze potevano avere sull'operatore. (17)

*Un ringraziamento particolare ad Alessandro per le foto di questo report e per la sua pazienza...*

## BIBLIOGRAFIA:

1. **Decreto Ministeriale 471/99:** Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n.22 e successive modificazioni e integrazioni.
2. **Decreto Legislativo n.152 del 2006:** Norme in materia ambientale
3. **Decreto Ministeriale 7 novembre 2008-allegato A:** Disciplina delle operazioni di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazionale, ai sensi dell'articolo 1, comma 996, della legge 27 dicembre 2006, n. 296.
4. **Decreto Ministeriale 4 agosto 2010:** operazione di dragaggio nei siti di bonifica di interesse nazione – modif. del DM 7 novembre 2008.
5. **Istituto Superiore di Sanità 5 luglio 2006 – prot. n. 0036565:** parere sulle procedure di classificazione di rifiuti contenenti idrocarburi o metalli pesanti.
6. **W. Graham Solomons, G. Ortaggi, D. Misiti:** [Chimica organica](#). Bologna, Zanichelli, 1988
7. **Napoleone Fabbri, Pierluigi Robino, Giampaolo Simonelli:** quaderni di analisi chimica strumentale: “spettrofotometria” , 2004
8. **Analisi degli idrocarburi nelle acque senza l’uso del freon:** Application note: Thermo Electron Corporation in collaborazione con SGS Italia S.p.A. Environmental Services, di Villafranca Padovana (PD)
9. **Metodologie analitiche di riferimento:** Programma di monitoraggio per il controllo dell’ambiente marino-costiero (triennio 2001-2003) ICRAM. Sedimenti-scheda 1 – campionamenti
10. **EPA Method 3550B:** Ultrasonic extraction
11. **EPA Method 3630C:** Silica gel cleanup
12. **EPA Method 8440:** Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrophotometry
13. **APAT-IRSA-CNR:** Metodi analitici per le acque. Costituenti organici. Idrocarburi totali: determinazione mediante spettrofotometria infrarossa.

**14. International Union of Pure and Applied Chemistry: “detection limit”.**

[Compendium of Chemical Terminology Internet edition](#)

**15. UNI CEI EN ISO/IEC 17025 2005:** Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura

**16. UNI ISO 3534-1:2000:** Statistica - Vocabolario e simboli - Probabilità e termini statistici generali

**17. Decreto Legislativo 2 febbraio 2002 n°25:** Attuazione della direttiva 98/24/CE sulla protezione della salute e della sicurezza dei lavoratori contro i rischi derivanti da agenti chimici durante il lavoro.